

Docket No. 211712US0X

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Brigitte BATHE, et al.
SERIAL NO: New Application
FILED: Herewith
FOR: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE METF GENE

GAU:
EXAMINER:

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

11050 U.S. PTO
09/919935
08/02/01

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☒ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number 60/294,279, filed May 31, 2001, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Germany	100 53 942.4	August 2, 2000
Germany	101 09 686.0	February 28, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Corwin Paul Umbach
CORWIN PAUL UMBACH Reg No 40,211

Norman F. Oblon
Registration No. 24,618

Robert W. Hahl
Registration No. 33,893



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



11050 U.S. PRO

09/919935



08/02/01

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

101 09 686.0

Anmeldetag:

28. Februar 2001

Anmelder/Inhaber:

Degussa AG, Düsseldorf/DE

Bezeichnung:

Neue für das metF-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Priorität:

2.8.2000 DE 100 53 942.4

IPC:

C 12 N, C 12 Q, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 12. Juni 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Weihmayr

Neue für das metF-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das metF-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, unter Verwendung von Bakterien, in denen das metF-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. die Methionin-Analoga α -Methyl-Methionin, Ethionin, Norleucin, N-acetylnorleucin, S-Trifluoromethylhomocystein, 2-amino-5-heprenoitsäure, Seleno-Methionin, Methioninsulfoximin, Methoxin, 1-Aminocyclopentan-Carboxylsäure oder auxotroph

für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und Aminosäuren wie z.B. L-Methionin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-
5 Aminosäure produzierender Stämme von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

10 Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

Werden im folgenden L-Methionin oder Methionin erwähnt,
15 sind damit auch die Salze wie z.B. Methionin-Hydrochlorid oder Methionin-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das metF-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der
20 Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine
25 Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz
von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der
5 Methylentetrahydrofolat Reduktase aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte
Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine
replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- 10 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1,
oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i)
innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Kodes entspricht, oder
- 15 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
(i) oder (ii) komplementären Sequenz
hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

20 ein Polynukleotid, enthaltend die Nukleo-
tidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt,

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid
kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2
dargestellt, enthält

25 ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid,
insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und

als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die den
Vektor enthalten oder in denen das metF-Gen verstärkt
ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit
5 der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung
10 enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für Methylentetrahydrofolat Reduktase kodieren, oder um solche Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene zu isolieren,
15 die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz der Methylentetrahydrofolat Reduktase aufweisen.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen
20 hergestellt werden kann, die für Methylentetrahydrofolat Reduktase kodieren.

Solche, als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende
25 Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 100, 150, 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

30 „Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es

sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene
5 Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Methylentetrahydrofolat Reduktase und auch solche ein, die zu wenigstens 70%,
10 bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders die zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die
15 insbesondere bereits Aminosäuren produzieren, und in denen die für das metF-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang
20 die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein
25 entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose,
30 Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art

Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

- 5 Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum (C. glutamicum), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
10 Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Corynebacterium melassecola ATCC17965
Brevibacterium flavum ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

- 15 oder daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise der L-Methionin produzierende Stamm

Corynebacterium glutamicum ATCC21608.

- 20 Das neue, für das Enzym Methylentetrahydrofolat Reduktase [EC:1.7.99.5]kodierende metF-Gen von C. glutamicum wurde isoliert.

- Zur Isolierung des metF-Gens oder auch anderer Gene von C. glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in Escherichia coli (E. coli) angelegt. Das
25 Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.:
30 Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde.

Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326) (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)).

Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli* Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mc r , der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Die neue für das Gen *metF* kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der

vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des metF-Genproduktes dargestellt.

- 5 Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der
10 Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins
15 führen, d.h. funktionsneutral sind.

Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et
20 al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

- 25 Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der
30 Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH
5 (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait:
10 Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des metF-Gens in verbesserter Weise
15 Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des
20 Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Methionin-Produktion zu
25 steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit
30 unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns
5 et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of
10 Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides
15 (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße metF-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in
20 coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den
25 kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet
30 werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and
35 Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur

Duplikation bzw. Amplifikation des *hom-thrB*-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum*

5 replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry

10 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR@Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der

15 Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994))

20 beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben.

25 Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin vorteilhaft sein, neben dem *metF*-

30 Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken.

So kann für die Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 • das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 10 • das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (ACCESSION Number P26512),
- 15 • das für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierende Gen metA (ACCESSION Number AF052652),
- das für die Cystathionin-gamma-Synthase kodierende Gen metB (ACCESSION Number AF126953),
- 20 • das für die Cystathionin-gamma-Lyase kodierende Gen aecD (ACCESSION Number M89931)
- das für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierende Gen glyA (JP-A-08107788),
- das für die O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase kodierende Gen metY (DSM 13556)
- 25 verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des metF Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Homoserine - Kinase kodierende Gen thrB (ACCESSION Number P08210),
- das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen ilvA (ACCESSION Number Q04513),
- 5 ◦ das für die Threonin Synthase kodierende Gen thrC (ACCESSION Number P23669),
- das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierende Gen ddh (ACCESSION Number Y00151),
- 10 ◦ das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478; DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE: 1995 1975.7; DSM 13114)
- 15 abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, neben der Überexpression des metF-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

- Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren
- 25 (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel
- 30 (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch

von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen
(Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den
Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen
5 von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im
Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der
American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA,
1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie
10 z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose,
Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B.
Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren
wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure,
Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische
15 Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe
können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige
Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt,
Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff
20 oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat,
Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und
Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen
können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Schwefelquelle, insbesondere für die Herstellung von
25 Methionin, können organische und anorganische
schwefelhaltige Verbindungen wie beispielsweise Sulfide,
Sulfite, Sulfate und Thiosulfate verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogen-
phosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die
30 entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das
Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie
z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum
notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachsstoffe

wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines
5 einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure
10 oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B.
15 Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die
20 Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die so erhaltenen, insbesondere L-Methionin enthaltenden
25 Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-% und enthalten L-Methionin. Vorteilhaft ist außerdem auch, wenn die Fermentation zumindest am Ende, insbesondere jedoch über mindestens 30% der Fermentationsdauer zuckerlimitiert gefahren wird. Das
30 heißt, dass während dieser Zeit die Konzentration an verwertbarem Zucker im Fermentationsmedium auf ≥ 0 bis 3 g/l gehalten, beziehungsweise abgesenkt wird.

Die in dieser Weise hergestellte, insbesondere L-Methionin haltige, Fermentationsbrühe wird anschließend
35 weiterverarbeitet. Je nach Anforderung kann die Biomasse

ganz oder teilweise durch Separationsmethoden wie z.B. der Zentrifugation, der Filtration, dem Dekantieren oder einer Kombination hieraus aus der Fermentationsbrühe entfernt oder vollständig in ihr belassen werden. Anschließend wird
5 diese mit bekannten Methoden wie z.B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, oder durch Nanofiltration eingedickt beziehungsweise konzentriert. Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann anschließend
10 durch Methoden der Gefriertrocknung, der Sprühtrocknung, der Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren zu einem vorzugsweise rieselfähigen, feinteiligen Pulver aufgearbeitet werden.

Dieses rieselfähige, feinteilige Pulver kann dann wiederum
15 durch geeignete Kompaktier- oder Granulier-Verfahren in ein grobkörniges, gut rieselfähiges, lagerbares und weitgehend staubfreies Produkt überführt werden. Vorteilhaft bei der Granulation oder Kompaktierung ist der Einsatz von üblichen organischen oder anorganischen Hilfsstoffen,
20 beziehungsweise Trägern wie Stärke, Gelatine, Cellulosederivaten oder ähnlichen Stoffen, wie sie üblicherweise in der Lebensmittel- oder Futtermittelverarbeitung als Binde-, Gelier-, oder Verdickungsmittel Verwendung finden, oder von weiteren Stoffen wie zum Beispiel
25 Kieselsäuren, Silikaten oder Stearaten.

Unter „rieselfähig“ versteht man Pulver, die aus einer Serie von Glasauslaufgefäßen mit verschiedenen großen Auslauföffnungen mindestens aus dem Gefäß mit der Öffnung 5 mm (Millimeter) ungehindert auslaufen (Klein, Seifen, Öle, Fette, Wachse 94, 12 (1968)).
30

Wie hier beschrieben, ist mit „feinteilig“, ein Pulver mit überwiegendem Anteil (> 50 %) einer Korngröße von 20 bis 200 µm Durchmesser gemeint. Mit „grobkörnig“ sind Produkte mit überwiegendem Anteil (> 50 %) einer Korngröße von 200
35 bis 2000 µm Durchmesser gemeint. In diesem Sinne, bedeutet

„staubfrei“, daß das Produkt lediglich geringe Anteile (< 5 %) an Körngrößen unter 20 µm Durchmesser enthält. Die Korngrößenbestimmung kann mit Methoden der Laserbeugungsspektrometrie durchgeführt werden. Die entsprechenden Methoden sind im Lehrbuch zur „Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis“ von R. H. Müller und R. Schuhmann, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1996) oder im Lehrbuch „Introduction to Particle Technology“ von M. Rhodes, Verlag Wiley & Sons (1998) beschrieben.

„Lagerbar“, im Sinne dieser Erfindung, bedeutet ein Produkt, das bis zu 120 Tagen, bevorzugt bis 52 Wochen, besonders bevorzugt 60 Monate gelagert werden kann ohne das ein wesentlicher Verlust (< 5%) an Methionin auftritt.

Alternativ kann das Produkt aber auch auf einen in der Futtermittelverarbeitung bekannten und üblichen organischen oder anorganischen Trägerstoff wie zum Beispiel Kieselsäuren, Silikate, Schrote, Kleien, Mehle, Stärken Zucker oder andere aufgezogen und/oder mit üblichen Verdickungs- oder Bindemitteln vermischt und stabilisiert werden. Anwendungsbeispiele und Verfahren hierzu sind in der Literatur (Die Mühle + Mischfuttertechnik 132 (1995) 49, Seite 817) beschrieben.

Schließlich kann das Produkt durch Beschichtungsverfahren („Coating“) mit Filmbildnern wie beispielsweise Metallcarbonate, Kieselsäuren, Silikate, Alginate, Stearate, Stärken, Gummis und Celluloseether, wie in der DE-C-4100920 beschrieben, in einen Zustand gebracht werden, in dem es stabil gegenüber der Verdauung durch Tiermägen insbesondere dem Magen von Wiederkäuern ist.

Wird die Biomasse während des Verfahrens abgetrennt, werden im allgemeinen weitere, zum Beispiel während der Fermentation zugesetzte anorganische Feststoffe entfernt. Daneben enthält das erfindungsgemäße

Tierfuttermitteladditiv zumindest den überwiegenden Teil der in der Fermentationsbrühe gelöst vorliegenden, weiteren gebildeten oder zugesetzten, insbesondere organische Stoffe, soweit sie nicht durch geeignete Verfahren
5 abgetrennt wurden.

In einem Aspekt der Erfindung kann die Biomasse bis zu 70%, bevorzugt bis zu 80%, bevorzugt bis zu 90%, bevorzugt bis zu 95%, und besonders bevorzugt bis zu 100% abgetrennt werden. In einem weiteren Aspekt der Erfindung werden bis
10 zu 20% der Biomasse, bevorzugt bis zu 15%, bevorzugt bis zu 10%, bevorzugt bis zu 5%, besonders bevorzugt keine Biomasse abgetrennt.

Zu diesen organischen Stoffen gehören organische Nebenprodukte, die von den bei der Fermentation
15 eingesetzten Mikroorganismen gegebenenfalls neben dem L-Methionin erzeugt und gegebenenfalls ausgeschieden werden. Dazu zählen L-Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Lysin, L-Valin, L-Threonin, L-Alanin oder L-Tryptophan. Dazu zählen Vitamine ausgewählt aus der Gruppe Vitamin B1
20 (Thiamin), Vitamin B2 (Riboflavin), Vitamin B5 (Pantothersäure), Vitamin B6 (Pyridoxin), Vitamin B12 (Cyanocobalamin), Nicotinsäure/Nicotinsäureamid und Vitamin E (Tocopherol). Dazu gehören weiterhin organische Säuren, die ein bis drei Carboxyl-Gruppen tragen wie zum Beispiel
25 Essigsäure, Milchsäure, Zitronensäure, Apfelsäure oder Fumarsäure. Schließlich gehören dazu auch Zucker wie zum Beispiel Trehalose. Diese Verbindungen sind gegebenenfalls erwünscht, wenn sie die nutritive Wertigkeit des Produktes verbessern.

30 Diese organischen Stoffe einschließlich des L-Methionins und/oder D-Methionins und/oder des racemischen Gemisches D,L-Methionin können auch je nach Anforderung während eines geeigneten Verfahrensschrittes als Konzentrat oder Reinsubstanz in fester oder flüssiger Form hinzugefügt
35 werden. Diese genannten organischen Stoffe können einzeln

oder als Mischungen zur erhaltenen oder aufkonzentrierten Fermentationsbrühe, oder auch während des Trocknungs- oder Granulationsprozesses hinzugefügt werden. Es ist

- 5 Mischung mehrerer organischen Stoffe zur Fermentationsbrühe und einen weiteren organischen Stoff oder eine weitere Mischung mehrerer organische Stoffe bei einem späteren Verfahrensschritt, beispielsweise der Granulation, hinzuzufügen.

- 10 Das oben beschriebene Produkt ist als Futtermittelzusatz, d.h. Futtermittel-Additiv, für die Tierernährung geeignet.

- Der L-Methionin-Gehalt des Tierfuttermittel-Additivs beträgt üblicherweise 1 Gew.-% bis 80 Gew.-%, bevorzugt 2 Gew.-% bis 80 Gew.-%, besonders bevorzugt 4 Gew.-% bis 80 Gew.-%, und ganz besonders bevorzugt 8 Gew.-% bis 80 Gew.-%, bezogen auf die Trockenmasse des Tierfuttermittel-Additivs. Gehalte von 1 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 2 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 4 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 6 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 1 Gew.-% bis 40 Gew.-%, 2 Gew.-% bis 40 Gew.-% oder 4 Gew.-% bis 40 Gew.-% sind gleichfalls möglich. Der Wassergehalt des Futtermittel-Additivs beträgt üblicherweise bis zu 5 Gew.-%, bevorzugt bis zu 4 Gew.-%, und besonders bevorzugt weniger als 2 Gew.-%.

- 25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist dementsprechend ein Verfahren zur Herstellung eines L-Methionin haltigen Tierfuttermittel-Additivs aus Fermentationsbrühen, gekennzeichnet durch die Schritte

- a) Kultivierung und Fermentation eines L-Methionin produzierenden Mikroorganismus in einem Fermentationsmedium;
- 30 b) Entfernung von Wasser aus der L-Methionin haltigen Fermentationsbrühe (Aufkonzentration);

- c) Entfernung der während der Fermentation gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 Gew.-%; und
- d) Trocknung der gemäß a) und/oder b) erhaltenen Fermentationsbrühe, um das Tierfuttermittel-Additiv in
5 der gewünschten Pulver- oder Granulatform zu erhalten.

Wenn erwünscht, können in dem erfindungsgemäßen Verfahren weiterhin eine oder mehrere der folgenden Schritte durchgeführt werden:

- e) Zusatz von einem oder mehreren der organischen Stoffe,
10 einschließlich L-Methionin und/oder D-Methionin und/oder des racemischen Gemisches D,L-Methionin, zu dem gemäß a), b) und/oder c) erhaltenen Produkten;
- f) Zugabe von Hilfstoffen zu den nach a) bis d) erhaltenen Stoffen zur Stabilisierung und Erhöhung der
15 Lagerfähigkeit ausgewählt aus der Gruppe Kieselsäuren, Silikate, Stearate, Schrot und Kleie; oder
- g) Überführung der nach a) bis e) erhaltenen Stoffe in eine Tiermagen insbesondere Pansen stabile Form durch Beschichtung („Coating“) mit Filmbildnern.

- 20 Die Analyse von L-Methionin kann durch Ionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen
25 Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus
Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032
5 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179)
beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI
(Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell
gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer
10 Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland,
Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)
dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1
(Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of
Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma
15 Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1
Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem
Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg,
Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02)
gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase
20 dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym
BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.
Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der
25 behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-
DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04)
behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit
Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La
30 Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing
Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des *E. coli* Stammes NM554 (Raleigh et al.
1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen
in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der

Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des metF-Gens

10 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im
15 Größensbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses
25 Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm

DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin
5 ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings
10 of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet.
15 Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt,
20 Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die
Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem
25 zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein
30 offenes Leseraster von 1046 Basenpaaren, welches als metF-Gen bezeichnet wurde. Das metF-Gen kodiert für ein Protein von 349 Aminosäuren.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Neue für das metF-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000363 BT

<140>

10 <141>

<160> 2

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1551

<212> DNA

20 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (299)..(1345)

25 <223> metF-Gen

<400> 1

gcgtcaagga cggactcaag tttttcagaa gaattcttat ggccttgccg cgccaggaaa 60

30 ccagcccacg cataaagagg acggattcgc tttcctccat tgagcacgaa actgcgaaga 120

tgggccacag catctgtgac aggagcgccg atatcagcaa ttgttagctc ttgagcatcg 180

aggaactgcg tcaaacgata tcgcacgacc tccggaaatt tgtcgaggtc aaggtcatgg 240

35 gcatcgaaac tgctcaagga gacgtccttc aatcgaatag ggggatgcgg gctgaatt 298

ttg gtg gag gtg aat aaa tgc cag agg cag tcc caa caa aac act ctc 346

Leu Val Glu Val Asn Lys Cys Gln Arg Gln Ser Gln Gln Asn Thr Leu

40 1 5 10 15

atc aca cta aga tac cca ggc atg tcc cta acg aac atc cca gcc tca 394

Ile Thr Leu Arg Tyr Pro Gly Met Ser Leu Thr Asn Ile Pro Ala Ser

20 25 30

45 tct caa tgg gca att agc gac gtt ttg aag cgt cct tca ccc ggc cga 442

Ser Gln Trp Ala Ile Ser Asp Val Leu Lys Arg Pro Ser Pro Gly Arg

35 40 45

50 gta cct ttt tct gtc gag ttt atg cca ccc cgc gac gat gca gct gaa 490

Val Pro Phe Ser Val Glu Phe Met Pro Pro Arg Asp Asp Ala Ala Glu

50 55 60

gag cgt ctt tac cgc gca gca gag gtc ttc cat gac ctc ggt gca tcg 538

55 Glu Arg Leu Tyr Arg Ala Ala Glu Val Phe His Asp Leu Gly Ala Ser

65 70 75 80

ttt gtc tcc gtg act tat ggt gct ggc gga tca acc cgt gag aga acc 586

Phe Val Ser Val Thr Tyr Gly Ala Gly Gly Ser Thr Arg Glu Arg Thr

85 90 95

	tca cgt att gct cga cga tta gcg aaa caa ccg ttg acc act ctg gtg	634
	Ser Arg Ile Ala Arg Arg Leu Ala Lys Gln Pro Leu Thr Thr Leu Val	
	100 105 110	
5	cac ctg acc ctg gtt aac cac act cgc gaa gag atg aag gca att ctt	682
	His Leu Thr Leu Val Asn His Thr Arg Glu Glu Met Lys Ala Ile Leu	
	115 120 125	
10	cgg gaa tac cta gag ctg gga tta aca aac ctg ttg gcg ctt cga gga	730
	Arg Glu Tyr Leu Glu Leu Gly Leu Thr Asn Leu Leu Ala Leu Arg Gly	
	130 135 140	
15	gat ccg cct gga gac cca tta ggc gat tgg gtg agc acc gat gga gga	778
	Asp Pro Pro Gly Asp Pro Leu Gly Asp Trp Val Ser Thr Asp Gly Gly	
	145 150 155 160	
20	ctg aac tat gcc tct gag ctc atc gat ctt att aag tcc act cct gag	826
	Leu Asn Tyr Ala Ser Glu Leu Ile Asp Leu Ile Lys Ser Thr Pro Glu	
	165 170 175	
25	ttc cgg gaa ttc gac ctc ggt atc gcc tcc ttc ccc gaa ggg cat ttc	874
	Phe Arg Glu Phe Asp Leu Gly Ile Ala Ser Phe Pro Glu Gly His Phe	
	180 185 190	
30	cgg gcg aaa act cta gaa gaa gac acc aaa tac act ctg gcg aag ctg	922
	Arg Ala Lys Thr Leu Glu Glu Asp Thr Lys Tyr Thr Leu Ala Lys Leu	
	195 200 205	
35	cgt gga ggg gca gag tac tcc atc acg cag atg ttc ttt gat gtg gaa	970
	Arg Gly Gly Ala Glu Tyr Ser Ile Thr Gln Met Phe Phe Asp Val Glu	
	210 215 220	
40	gac tac ctg cga ctt cgt gat cgc ctt gtc gct gca gac ccc att cat	1018
	Asp Tyr Leu Arg Leu Arg Asp Arg Leu Val Ala Ala Asp Pro Ile His	
	225 230 235 240	
45	ggt gcg aag cca atc att cct ggc atc atg ccc att acc gag ctg cgg	1066
	Gly Ala Lys Pro Ile Ile Pro Gly Ile Met Pro Ile Thr Glu Leu Arg	
	245 250 255	
50	tct gtg cgt cga cag gtc gaa ctc tct ggt gct caa ttg ccg agc caa	1114
	Ser Val Arg Arg Gln Val Glu Leu Ser Gly Ala Gln Leu Pro Ser Gln	
	260 265 270	
55	cta gaa gaa tca ctt gtt cga gct gca aac ggc aat gaa gaa gcg aac	1162
	Leu Glu Glu Ser Leu Val Arg Ala Ala Asn Gly Asn Glu Glu Ala Asn	
	275 280 285	
60	aaa gac gag atc cgc aag gtg ggc att gaa tat tcc acc aat atg gca	1210
	Lys Asp Glu Ile Arg Lys Val Gly Ile Glu Tyr Ser Thr Asn Met Ala	
	290 295 300	
65	gag cga ctc att gcc gaa ggt gcg gaa gat ctg cac ttc atg acg ctt	1258
	Glu Arg Leu Ile Ala Glu Gly Ala Glu Asp Leu His Phe Met Thr Leu	
	305 310 315 320	

```

aac ttc acc cgt gca acc caa gaa gtg ttg tac aac ctt ggc atg gcg 1306
Asn Phe Thr Arg Ala Thr Gln Glu Val Leu Tyr Asn Leu Gly Met Ala
          325                      330                      335

5  cct gct tgg gga gca gag cac ggc caa gac gcg gtg cgt taagccctct 1355
Pro Ala Trp Gly Ala Glu His Gly Gln Asp Ala Val Arg
          340                      345

10 taggaatcat gaagggggag ggcggtgatc aatacggcaa acggccgttg atccccgtca 1415
aacctaaact gcctgagcaa gtcagtgaag ccgagagagc gatacaggct aaacgcatgg 1475
ttcgccctcat cgtcgacctc ggggtgtagac aaaatggcaa aagtgttttg tttgtctttt 1535

15 aacagttcat gcatca 1551

<210> 2
<211> 349
20 <212> PRT
   <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2
25 Leu Val Glu Val Asn Lys Cys Gln Arg Gln Ser Gln Gln Asn Thr Leu
   1          5          10          15

   Ile Thr Leu Arg Tyr Pro Gly Met Ser Leu Thr Asn Ile Pro Ala Ser
          20          25          30

30 Ser Gln Trp Ala Ile Ser Asp Val Leu Lys Arg Pro Ser Pro Gly Arg
          35          40          45

   Val Pro Phe Ser Val Glu Phe Met Pro Pro Arg Asp Asp Ala Ala Glu
          50          55          60

35 Glu Arg Leu Tyr Arg Ala Ala Glu Val Phe His Asp Leu Gly Ala Ser
   65          70          75          80

   Phe Val Ser Val Thr Tyr Gly Ala Gly Gly Ser Thr Arg Glu Arg Thr
          85          90          95

40 Ser Arg Ile Ala Arg Arg Leu Ala Lys Gln Pro Leu Thr Thr Leu Val
          100          105          110

45 His Leu Thr Leu Val Asn His Thr Arg Glu Glu Met Lys Ala Ile Leu
          115          120          125

   Arg Glu Tyr Leu Glu Leu Gly Leu Thr Asn Leu Leu Ala Leu Arg Gly
          130          135          140

50 Asp Pro Pro Gly Asp Pro Leu Gly Asp Trp Val Ser Thr Asp Gly Gly
   145          150          155          160

   Leu Asn Tyr Ala Ser Glu Leu Ile Asp Leu Ile Lys Ser Thr Pro Glu
          165          170          175

55 Phe Arg Glu Phe Asp Leu Gly Ile Ala Ser Phe Pro Glu Gly His Phe
          180          185          190

```

Arg Ala Lys Thr Leu Glu Glu Asp Thr Lys Tyr Thr Leu Ala Lys Leu
 195 200 205
 5 Arg Gly Gly Ala Glu Tyr Ser Ile Thr Gln Met Phe Phe Asp Val Glu
 210 215 220
 Asp Tyr Leu Arg Leu Arg Asp Arg Leu Val Ala Ala Asp Pro Ile His
 225 230 235 240
 10 Gly Ala Lys Pro Ile Ile Pro Gly Ile Met Pro Ile Thr Glu Leu Arg
 245 250 255
 Ser Val Arg Arg Gln Val Glu Leu Ser Gly Ala Gln Leu Pro Ser Gln
 260 265 270
 15 Leu Glu Glu Ser Leu Val Arg Ala Ala Asn Gly Asn Glu Glu Ala Asn
 275 280 285
 20 Lys Asp Glu Ile Arg Lys Val Gly Ile Glu Tyr Ser Thr Asn Met Ala
 290 295 300
 Glu Arg Leu Ile Ala Glu Gly Ala Glu Asp Leu His Phe Met Thr Leu
 305 310 315 320
 25 Asn Phe Thr Arg Ala Thr Gln Glu Val Leu Tyr Asn Leu Gly Met Ala
 325 330 335
 Pro Ala Trp Gly Ala Glu His Gly Gln Asp Ala Val Arg
 340 345
 30

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,
enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus
der Gruppe
 - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid
kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No.
2 enthält,
 - b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens
70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von
SEQ ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
Polynukleotiden von a) oder b), und
 - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der
Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das
Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien
replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das
Polynukleotid eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die
Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1,
oder
 - (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i)
innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Kodes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

- 5 6. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 2 darstellt, enthält.
7. Coryneforme Bakterien, in denen das metF-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.
- 10 8. Als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, d a d u r c h
15 g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte durchführt:
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das metF-Gen oder dafür kodierende
20 Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert;
- b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.
- 25 10. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

11. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest
teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der
gewünschten L-Aminosäure verringern.
12. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man einen mit einem
Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der
Plasmidvektor die für das metF-Gen kodierende
Nukleotidsequenz trägt.
13. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression
des (der) Polynukleotides (e), das (die) für das metF-
Gen kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere
überexprimiert.
14. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die katalytischen
Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) erhöht,
für das das Polynukleotid metF kodiert.
15. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin,
coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man
gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt
aus der Gruppe
- 15.1 das für eine feed back resistente
Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 15.2 das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat
Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 15.3 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende
Gen pgk,

- 15.4 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen
pyc,
- 15.5 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende
Gen tpi
- 5 15.6 das für die Homoserin O-Acetyltransferase
kodierende Gen metA
- 15.7 das für die Cystahionin-gamma-Synthase
kodierende Gen metB
- 10 15.8 das für die Cystahionin-gamma-Lyase kodierende
Gen aecD
- 15.9 das für die Serin-Hydroxymethyltransferase
kodierende Gen glyA
- 15.10 das für die O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase
kodierende Gen metY

15

verstärkt bzw. überexprimiert.

16. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin,
20 coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man
gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt
aus der Gruppe

- 16.1 das für die Homoserine - Kinase kodierende Gen
thrB
- 25 16.2 das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen
ilvA
- 16.3 das für die Threonin Synthase kodierende Gen
thrC

- 16.4 das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase
kodierende Gen ddh
- 16.5 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende Gen pck
- 5 16.6 das für die Glucose-6-Phosphat6 Isomerase
kodierende Gen pgi
- 16.7 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
- abschwächt.
- 10 17. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden
Ansprüche, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen
der Art Corynebacterium glutamicum einsetzt.
- 15 18. Verfahren zur Herstellung eines L-Methionin haltigen
Tierfuttermittel-Additivs aus Fermentationsbrühen,
gekennzeichnet durch die Schritte
- a) Kultivierung und Fermentation eines L-Methionin
produzierenden Mikroorganismus in einem
Fermentationsmedium;
- 20 b) Entfernung von Wasser aus der L-Methionin
haltigen Fermentationsbrühe (Aufkonzentration);
- c) Entfernung der während der Fermentation
gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100
Gew.-%; und
- 25 d) Trocknung der gemäß b) und/oder c) erhaltenen
Fermentationsbrühe, um das Tierfuttermittel-
Additiv in der gewünschten Pulver- oder
Granulatform zu erhalten.

19. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet dass daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges von L-Methionin verstärkt.
- 5 20. Verfahren gemäß Anspruch 19, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung L-Methionin verringern.
- 10 21. Verfahren gemäß Anspruch 19, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression der Polynukleotide, die für das metF-Gen kodieren verstärkt, insbesondere überexprimiert.
- 15 22. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen der Art Corynebacterium glutamicum einsetzt.
- 20 23. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet dass man zusätzlich noch einen oder mehrere folgender Schritte durchführt:
- 25 e) Zusatz von einem oder mehreren der organischen Stoffe, einschließlich L-Methionin und/oder D-Methionin und/oder des racemischen Gemisches D,L-Methionin, zu dem gemäß b), c) und/oder d) erhaltenen Produkten;
- 30 f) Zugabe von Hilfstoffen zu den nach b) bis e) erhaltenen Stoffen zur Stabilisierung und Erhöhung der Lagerfähigkeit ausgewählt aus der Gruppe Kieselsäuren, Silikate, Stearate, Schrot und Kleie; oder
- g) Überführung der nach b) bis f) erhaltenen Stoffe in eine Tiermagen insbesondere Pansen stabile

Form durch Beschichtung („Coating“) mit
Filmbildnern.

24. Verfahren gemäß Anspruch 18 oder 23, dadurch
gekennzeichnet dass ein Teil der Biomasse entfernt
wird.
25. Verfahren gemäß Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet
dass bis zu 100% der Biomasse entfernt wird.
26. Verfahren gemäß Anspruch 18 oder 23, dadurch
gekennzeichnet dass der Wassergehalt bei bis zu
5 Gew.-% liegt.
27. Verfahren gemäß Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet
dass der Wassergehalt bei weniger als 2 Gew.-% liegt.
28. Verfahren gemäß Anspruch 23, 24, 25, 26 oder 27,
dadurch gekennzeichnet dass die Filmbildner
Metallcarbonate, Kieselsäuren, Silikate, Alginate,
Stearate, Stärken, Gummis oder Celluloseether sind.
29. Tierfuttermittel-Additiv hergestellt gemäß Ansprüchen
18 bis 28.
30. Tierfuttelmittel-Additiv gemäß Anspruch 29, dadurch
gekennzeichnet dass es 1 Gew.-% bis 80 Gew.-%
L_Methionin, D-Methionin, D,L-Methionin oder einer
Mischung davon, bezogen auf die Trockenmasse des
Tierfuttermittel-Additivs, enthält.
31. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder
Gene zu isolieren, die für die Methylenetetrahydrofolat
Reduktase kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der
Sequenz des Methylenetetrahydrofolat Reduktase Gens
aufweisen, dadurch gekennzeichnet, dass man die
Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1, 2, 3 oder 4
als Hybridisierungssonden einsetzt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
10 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das metF-Gen verstärkt vorliegt, und die
20 Verwendung der Polynukleotidsequenzen als Hybridisierungssonden.